

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2001年 2月 8日

出願番号
Application Number:

特願2001-032729

[ST.10/C]:

[JP2001-032729]

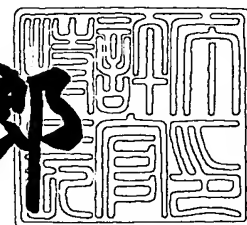
出願人
Applicant(s):

東洋水産株式会社

2003年 6月17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3047192



特 2 0 0 1 - 0 3 2 7 2 9

【書類名】 特許願

【整理番号】 A000007397

【提出日】 平成13年 2月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 4/00
A61K 38/00

【発明の名称】 新規ペプチド、その誘導体、その製造方法、それを産生
する新規菌株、およびそれらを有効成分として含有する
抗ウイルス剤

【請求項の数】 18

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区港南2丁目13番40号 東洋水産株式会社
内

【氏名】 石間 正浩

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区港南2丁目13番40号 東洋水産株式会社
内

【氏名】 好田 勉

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区港南2丁目13番40号 東洋水産株式会社
内

【氏名】 山崎 隆之

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県野田市山崎2641 東京理科大学内

【氏名】 菅原 二三男

【特許出願人】

【識別番号】 000222783

【氏名又は名称】 東洋水産株式会社

【代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100092196

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 良郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100091351

【弁理士】

【氏名又は名称】 河野 哲

【選任した代理人】

【識別番号】 100088683

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 誠

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9006251

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ペプチド、その誘導体、その製造方法、それを産生する新規菌株、およびそれらを有効成分として含有する抗ウイルス剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 構成アミノ酸が、グルタミン由来のアミノ酸 4 残基、グルタミン酸 1 残基、セリン 1 残基、バリン 2 残基、イソロイシン 1 残基およびロイシン 5 残基であり、3-ヒドロキシデカノイル基が N 末端のロイシン残基にアミド結合したペプチド又はその塩。

【請求項 2】 前記グルタミン由来のアミノ酸がグルタミンであり、前記ペプチドが環状構造を有しているデプシペプチドであることを特徴とする請求項 1 に記載のペプチド又はその塩。

【請求項 3】 前記グルタミン由来のアミノ酸が α , γ -ジアミノ酪酸であり、前記ペプチドが環状構造を有しているデプシペプチドであることを特徴とする請求項 1 に記載のペプチド又はその塩。

【請求項 4】 前記グルタミン由来のアミノ酸が α , γ -ジアミノ酪酸であり、前記ペプチドが鎖状構造を有しているペプチドであることを特徴とする請求項 1 に記載のペプチド又はその塩。

【請求項 5】 請求項 2 に記載のペプチドの低級アルキル化誘導体又はその塩。

【請求項 6】 構成アミノ酸が、グルタミンおよびグルタミン酸の総数が 5 残基、セリン 1 残基、バリン 3 残基、並びにロイシン 5 残基であり、有機化合物が前記アミノ酸のいずれかに共有結合したペプチド又はその塩。

【請求項 7】 構成アミノ酸が、グルタミンおよびグルタミン酸の総数が 5 残基、セリン 1 残基、バリン 2 残基、イソロイシン 1 残基、並びにロイシン 5 残基であり、有機化合物が前記アミノ酸のいずれかに共有結合したペプチド又はその塩。

【請求項 8】 シュードモナス (*Pseudomonas*) 属の新種の菌株。

【請求項 9】 抗ウイルス活性を有する物質を産生する能力を有することを

特徴とするシュードモナス属の新種の菌株。

【請求項 1 0】 請求項 1、6 および 7 に記載されるペプチドの少なくとも 1 種を産生する能力を有することを特徴とするシュードモナス属の菌株。

【請求項 1 1】 請求項 1、6 および 7 に記載されるペプチドの少なくとも 1 種を産生する能力を有することを特徴とする *Pseudomonas* sp. Rt I B 0 2 6。

【請求項 1 2】 受託番号 F E R M B P - 7 4 3 6 で寄託された *Pseudomonas* sp. Rt I B 0 2 6。

【請求項 1 3】 (a) 請求項 1、5、6 および 7 に記載される、ペプチド又はその誘導体並びにこれらの薬学的に許容し得る塩の少なくとも何れか 1 種、並びに

(b) 請求項 8 ないし 1 2 に記載される菌株の少なくとも何れか 1 種からなる群から選択される少なくとも何れか 1 種を有効成分として含有する抗ウイルス剤。

【請求項 1 4】 脂質膜を有するウイルスに有効な請求項 1 3 の抗ウイルス剤。

【請求項 1 5】 二本鎖 DNA 又は一本鎖 RNA を有するウイルスに有効な請求項 1 3 又は 1 4 の抗ウイルス剤。

【請求項 1 6】 動物（ヒトを含む）の疾病原因ウイルスに有効な請求項 1 3 ないし 1 5 の何れか 1 項の抗ウイルス剤。

【請求項 1 7】 前記動物が、哺乳類（ヒトを含む）、魚類および甲殻類からなる群から選択される請求項 1 6 の抗ウイルス剤。

【請求項 1 8】 請求項 1、6 および 7 のペプチドからなる群から選択される少なくとも 1 種のペプチドを産生する能力を有する菌体を培養し、その培養物より請求項 1、6 および 7 のペプチドからなる群から選択される少なくとも 1 種のペプチドを回収することを特徴とする請求項 1、6 および 7 のペプチドからなる群から選択される少なくとも 1 種のペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なペプチド並びにその誘導体および塩に関する。

また、本発明は、新規なペプチドを産生することのできる新規な菌株に関する。

さらに、本発明は、新規なペプチドの製造方法にも関する。

また、本発明は、（a）上記新規なペプチドおよびその誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、並びに（b）上記新規な菌株、からなる群から選択される少なくとも一種を有効成分として含有する抗ウイルス剤にも関する。

【0002】

【従来の技術】

日本国内および世界各国の水産養殖業界において、多種多様な水産資源の安定な生産が望まれているが、高密度飼育や水質汚染等の環境悪化により、時としてウイルスや細菌および真菌等の感染症の被害が発生することがある。中には被害が甚大である感染症もあり、その疾病が流行した年の生産高に大きく影響することもある。以上のような背景から考えて、感染症に対する予防対策の可否が水産養殖事業の成否を分ける重要な要素であるといっても過言ではない。

【0003】

さらに、近年になり毎年新たなウイルス病の流行が絶えず発生しており、その被害額は増加傾向にあることから、水産養殖業界ではウイルス病が重要視されており、それらの対策が急務の課題となっている。

【0004】

このようなウイルス病を予防および治療する手段としてはワクチンや抗ウイルス剤の利用が検討されており、ワクチンについてはすでにマダイのイリドウイルスワクチンが実用化されている。一方、抗ウイルス剤については未だ実用化にはいたっていないが、研究開発段階ではいくつか報告がなされている。例えば、特開平1-95792号公報には、*Pseudomonas* sp. 46NW-04A（FERM P-9579）が産生する物質（46NW-04A）はサケ科魚類のヘルペスウイルス（OMV）や伝染性造血器壊死症ウイルス（IHNV）のようなウイルスに対して抗ウイルス活性を有することが記載されている。

【0005】

上記物質に関しては、水産学シリーズ 79、「海洋微生物の生物活性物質」、日本水産学会監修、株式会社恒星社厚生閣（平成2年4月15日発行）にも記載されている。記載事項によると、上記公報に記載される抗ウイルス活性を有する物質（46NW-04A）が、構成成分としてトレオニン1残基、セリン2残基、バリン1残基、グルタミン酸1残基、イソロイシン1残基およびロイシン3残基であり、ロイシンのN末端に3-ヒドロキシデカノイル基が結合した分子式 $C_{54}H_{95}N_9O_{16}$ の白色粉末であると記載されており、上記物質（46NW-04A）はHIRAMOTOらの報告（Tetrahedron Letters 13巻、1087～1090頁）したビスコシンに極めて類似した構造を有することが記載されている。また、この物質（46NW-04A）を産生する *Pseudomonas* 属の細菌が、*Pseudomonas fluorescens* biovar I と同定されたことも報告されている。

【0006】

上記ビスコシンに関しては上記報告以外にも何種類かの類似化合物が報告されており、目的および用途も多種多様である。

しかしながら、上記報告例以外にも魚病ウイルスの予防又は治療を目的とした開発に関する報告が多数なされているにも関わらず、ウイルス病の予防又は治療を目的とした水産用医薬品の上市は前記したようにマダイのイリドウイルス症ワクチンの1例のみであり、十分な状況には至っていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、新規な抗ウイルス剤を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究した結果、魚類由来腸内細菌のなかにIHN（伝染性造血器壊死症）の原因ウイルスであるIHNV（サケ科魚類の伝染性造血器壊死症原因ウイルス）等に対する抗ウイルス剤の有効成分となり得る物質を見出し、

本発明を完成した。具体的には、本発明者らが見出した新規な物質は、構成アミノ酸が、グルタミン由来のアミノ酸 4 残基、グルタミン酸 1 残基、セリン 1 残基、バリン 2 残基、イソロイシン 1 残基およびロイシン 5 残基であり、3-ヒドロキシデカノイル基がN末端のロイシン残基にアミド結合したペプチドである。本発明は、この新規な物質およびその塩、並びにこの新規な物質およびその薬学的に許容される塩からなる群から選択される少なくとも 1 種を有効成分として含有する抗ウイルス剤を提供する。

【0009】

より詳細には、上記本発明者らが見出した抗ウイルス剤の有効成分には、次のペプチドが含まれる：

構成アミノ酸が、グルタミン 4 残基、グルタミン酸 1 残基、セリン 1 残基、バリン 2 残基、イソロイシン 1 残基およびロイシン 5 残基であり、3-ヒドロキシデカノイル基がN末端のロイシン残基にアミド結合した、環状構造を有するデプシペプチド（以下、「本発明のペプチドMA026」ともいう。）。

【0010】

さらに、本発明者らは、上記本発明のペプチドMA026から誘導される 3 種類のペプチド誘導体も抗ウイルス剤の有効成分として使用し得ることを見出した。これらの 3 種類のペプチド誘導体も新規物質である。本発明は、これらの新規な誘導体およびその塩、並びにこれらの誘導体およびその薬学的に許容される塩からなる群から選択される少なくとも 1 種を有効成分として含有する抗ウイルス剤を提供する。

【0011】

上記抗ウイルス剤の有効成分である 3 種類の誘導体のうち、第 1 の誘導体とは、構成アミノ酸が、グルタミン 4 残基、グルタミン酸 1 残基、セリン 1 残基、バリン 2 残基、イソロイシン 1 残基およびロイシン 5 残基であり、3-ヒドロキシデカノイル基がN末端のロイシン残基にアミド結合した、環状構造を有するデプシペプチドを低級アルキル化した誘導体（以下、「本発明のペプチドA1-MA026」ともいう。）である。

【0012】

第2の誘導体とは、構成アミノ酸が、 α 、 γ -ジアミノ酪酸4残基、グルタミン酸1残基、セリン1残基、バリン2残基、イソロイシン1残基およびロイシン5残基であり、3-ヒドロキシデカノイル基がN末端のロイシン残基にアミド結合した、環状構造を有するデプシペプチド誘導体（以下、「本発明のペプチドBTI-MA026」ともいう。）である。

【0013】

第3の誘導体とは、構成アミノ酸が、 α 、 γ -ジアミノ酪酸4残基、グルタミン酸1残基、セリン1残基、バリン2残基、イソロイシン1残基およびロイシン5残基であり、3-ヒドロキシデカノイル基がN末端のロイシン残基にアミド結合した、鎖状ペプチド誘導体（以下、「本発明のペプチドBTI-baseMA026」ともいう。）である。

【0014】

また、本発明者らは、上記本発明のペプチドMA026に追加して、抗ウイルス剤の有効成分として使用し得る第2および第3のペプチドも見出した。これらの第2および第3のペプチドも新規物質である。本発明は、これらの第2および第3のペプチド並びにその塩を提供する。さらに、本発明は、これらの第2および第3のペプチド並びにその薬学的に許容される塩からなる群から選択される少なくとも1種を有効成分として含有する抗ウイルス剤も提供する。

【0015】

本発明が提供する第2のペプチドとは、構成アミノ酸が、グルタミンおよびグルタミン酸の総数が5残基、セリン1残基、バリン3残基、並びにロイシン5残基であり、有機化合物が前記アミノ酸のいずれかに共有結合したペプチド（以下、「本発明のペプチドR1MA026」ともいう。）である。

【0016】

第3のペプチドとは、構成アミノ酸が、グルタミンおよびグルタミン酸の総数が5残基、セリン1残基、バリン2残基、イソロイシン1残基、並びにロイシン5残基であり、有機化合物が前記アミノ酸のいずれかに共有結合したペプチド（以下、「本発明のペプチドR2MA026」ともいう。）である。

【0017】

上記本発明のペプチドMA026、R1MA026およびR2MA026は、*Pseudomonas* 属の新種の菌株の培養液から精製することができる。本発明は、この*Pseudomonas* 属の菌株（以下、「本発明のRtIB026株」ともいう。）、およびこの菌株の培養物から本発明のペプチドMA026、R1MA026およびR2MA026の少なくとも1種を製造する方法も提供する。

【0018】

本発明のRtIB026株は、産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP- 7436で2001年1月29日に寄託された菌株である。

【0019】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の抗ウイルス剤の有効成分として使用することのできる請求項2、6および7に記載される3種類のペプチドについて詳細に説明する。

【0020】

本発明のペプチドMA026は、構成アミノ酸残基が、グルタミン4残基、グルタミン酸1残基、セリン1残基、バリン2残基、イソロイシン1残基およびロイシン5残基からなる。本発明のペプチドMA026のN末端のアミノ酸残基は、ロイシンであり、このロイシンのアミノ基に3-ヒドロキシデカノイル基がアミド結合している。また、本発明のペプチドMA026は、環状構造を有している。この環状構造は、ペプチドを構成するアミノ酸残基のうち、セリンの水酸基とイソロイシンのカルボキシ基との間のエステル結合により形成されている。

【0021】

本発明のペプチドMA026の塩には、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩）、アルカリ土類金属塩（例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩）、塩酸塩および酢酸塩が含まれるが、これらに限定されない。

【0022】

本発明のペプチドMA026は、魚類の消化管から分離した*Pseudomonas* 属の菌株の培養物から回収することができる。具体的には、本発明者らが

見出した *Pseudomonas* 属の新種の菌株（本発明の RtIB026 株）の培養液を濾過、濃縮、脱塩、シリカゲルカラムによる分離、高速液体クロマトグラフィーによる分離を行うことによって分離精製することができる。魚類の消化管から本発明のペプチド MA026 を産生する菌株を分離する方法の一例を後掲の実施例 1 に示す。

【0023】

本発明者らが見出した *Pseudomonas* 属の新種の菌株は、産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP- 7436 として 2001 年 1 月 29 日に寄託した。

【0024】

本発明の RtIB026 株について以下に詳細に説明する。

本発明の RtIB026 株の菌学的性質を調べた結果を以下に説明する。

【0025】

1) 生理学的性質検査

本発明の RtIB026 株の生理学的性質についての検査結果を以下の表 1 に示す。検査方法は Stanier らの報告 (J. Gen. Microbiol., 43, 159-271, 1966) に従った。

【0026】

【表 1-1】

表 1

| 性状検査項目 | |
|----------------|-------|
| グラム染色性 | - |
| 運動性 | + |
| 鞭毛数 | > 1 |
| 蛍光色素産生 | + |
| オキシダーゼ | + |
| ゼラチン液化 | + |
| リパーゼ (Tween80) | - |
| デンプンの加水分解 | - |
| DNA 分解能 | - |
| レシチン分解能 | + |
| 菌体外での PHB の分解能 | - |
| シュクロースからのレバン形成 | - |
| PHB の蓄積 | - |
| 4℃での発育 | + |
| 37℃での発育 | + |
| 39℃での発育 | + |
| 41℃での発育 | - |
| O-F テスト | 0 |
| 脱窒反応 | - |
| DNA G+C 含量 | 64.7% |

【0027】

【表1-2】

表1 (つづき)

| 炭素原の資化性 | |
|---------------|---|
| 乳酸ナトリウム | + |
| クエン酸ナトリウム | + |
| グリセロール | + |
| Ｌ-グルタミン酸ナトリウム | + |
| Ｌ-アルギニン | + |
| Ｄ-マンニトール | + |
| グルコース | + |
| グリシン | - |
| エタノール | - |
| マンニトール | + |
| Ｌ-アラニン | + |
| β-アラニン | + |
| Ｌ-ロイシン | + |
| Ｌ-イソロイシン | + |
| Ｌ-バリン | + |
| Ｌ-ヒスチジン | + |
| Ｌ-フェニルアラニン | + |
| Ｄ-キシロース | - |
| ガラクトース | - |
| シュクロース | - |
| エリスリトール | - |
| ソルビトール | - |
| Ｌ-トリプトファン | - |
| サルコシン | + |
| m-イノシトール | - |
| プロピレングリコール | - |
| Ｌ-アラビノース | - |
| ブチラミン | + |
| ヒスタミン | + |
| トレハオース | - |

【0028】

上記表1に示すように、グラム染色陰性、桿菌、鞭毛を持って運動し、O-F

テストがOxidativeである等の結果から本菌株は*Pseudomonas* 属に属すると考えられる。

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 1, 1984) に記載されている細菌種の中で本菌株と最も性状の類似している菌株は、*P. fluorescens* biovar Vであった。しかしながら、DNA G+C含量が4%以上異なることから、本菌株は、*P. fluorescens* biovar Vとは異なる。

【0029】

2) 16SrDNA塩基配列の比較

本発明のRtIB026株の16SrDNA塩基配列を決定し、得られた配列をもとに系統解析を定法に従い行ったところ、標準菌株である*Pseudomonas fluva*、*P. putida* (biovar A)、*P. plecoglossicida*、*P. oryzihabitans*等の菌株と、98%以上の相同性があり、系統樹において同一のクラスターに属する菌株であることが明らかとなった。

【0030】

3) DNA-DNA相同性試験

上記16SrDNAの塩基配列の比較から本発明のRtIB026株と98%以上の相同性が認められた4菌株、*Pseudomonas fluva*、*P. putida* (biovar A)、*P. plecoglossicida*、*P. oryzihabitans*を対象にDNA-DNA相同性試験を行った。この結果、試験した4菌株全てで相同性が70%以下となった。

以下の表2に、相同性の割合を示す。なお、表2には上述した16SrDNAの結果も併せて示した。

【0031】

【表 2】

| 表 2 近縁標準菌株と R t I B O 2 6 株との相同性 (%) | | |
|---|---------|-------------|
| 対象菌株 | 16SrDNA | DNA-DNA 相同性 |
| <i>Pseudomonas putida</i> bv. A (IAM1236) | 98.3 | 33 |
| <i>Pseudomonas fulva</i> (IAM1529) | 98.3 | 54 |
| <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> (FPC951) | 99 | 44 |
| <i>Pseudomonas oryzae</i> (JCM2952) | 98.5 | 34 |

【0032】

このDNA-DNA相同性試験によって70%以上の相同性が見られた細菌株は同一種とみなされることが国際微生物分類委員会によって定められている (Int. J. Syst. Bacteriol., Vol. 37, No. 4, 463-464 (1987))。

【0033】

以上の1)～3)の結果および新規な物質である本発明のペプチドMA026等を産生することから、本発明者らは、本発明のR t I B O 2 6株は新種の菌株であると決定した。

【0034】

本発明の*Pseudomonas*属に属する新種の菌株には、本発明のR t I B O 2 6株、その子孫およびそれらの変異体であって、本発明のペプチドMA026、R1MA026およびR2MA026の少なくとも1種を産生することのできる菌株も含まれる。

【0035】

本発明のペプチドMA026の製造方法、並びにR1MA026およびR2MA026とそれらの製造方法について以下に説明する。

本発明のペプチドMA026、R1MA026およびR2MA026は、本発明のRtIB026株の培養液をカラムクロマトグラフィー等に従事することにより精製することができる。

【0036】

具体的には、本発明のRtIB026株の培養液を、シリカゲルクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーに従事することにより精製することができる。本発明のペプチドMA026、R1MA026およびR2MA026を本発明のRtIB026株の培養液から精製する方法の一例を後掲の実施例2に示した。

【0037】

図1は、実施例2に記載の方法に従って行った高速液体クロマトグラフィーのクロマトグラムの一例である。図1に示す3つのピークのうち、保持時間17.7分（ピーク番号1）で溶出される画分に本発明のペプチドR1MA026が含まれる。保持時間19.0分（ピーク番号2）で溶出される画分に本発明のペプチドMA026が含まれる。保持時間21.4分（ピーク番号3）で溶出される画分に本発明のペプチドR2MA026が含まれる。

【0038】

本発明のペプチドR1MA026は、構成アミノ酸残基が、グルタミンおよびグルタミン酸の総数が5残基、セリン1残基、バリン3残基、並びにロイシン5残基からなるペプチドであって、前記アミノ酸のいずれかに共有結合している有機化合物があることを確認した。この本発明のペプチドR1MA026について質量分析等を行ったところ、それらのデータからは共有結合した有機化合物が、アミノ酸残基にアミド結合した脂肪酸であることを否定する結果は得られなかった。

本発明のペプチドR1MA026の塩には、上記本発明のペプチドMA026で述べたものが含まれるがそれらに限定されるものではない。

【0039】

本発明のペプチドR2MA026は、構成アミノ酸が、グルタミンおよびグルタミン酸の総数が5残基、セリン1残基、バリン2残基、イソロイシン1残基、

並びにロイシン 5 残基からなるペプチドであって、前記アミノ酸のいずれかに共有結合している有機化合物があることを確認した。この本発明のペプチド R 2 M A 0 2 6 について質量分析等を行ったところ、それらのデータからは共有結合した有機化合物が、アミノ酸残基にアミド結合した脂肪酸であることを否定する結果は得られなかった。

本発明のペプチド R 2 M A 0 2 6 の塩には、上記本発明のペプチド M A 0 2 6 で述べたものが含まれるがそれらに限定されるものではない。

【 0 0 4 0 】

次に、本発明のペプチド M A 0 2 6 から誘導される 3 種類のペプチド誘導体について詳細に説明する。

【 0 0 4 1 】

第 1 の誘導体（本発明のペプチド A 1 - M A 0 2 6 ）は、上述した本発明のペプチド M A 0 2 6 を低級アルキル化した誘導体である。即ち、本発明のペプチド A 1 - M A 0 2 6 の構成アミノ酸残基は、グルタミン 4 残基、グルタミン酸 1 残基、セリン 1 残基、バリン 2 残基、イソロイシン 1 残基およびロイシン 5 残基からなり、ロイシンのアミノ基に 3 - ヒドロキシデカノイル基がアミド結合している。また、環状構造は、ペプチドを構成するアミノ酸残基のうち、セリンの水酸基とイソロイシンのカルボキシ基との間のエステル結合により形成されている。

【 0 0 4 2 】

低級アルキル基としては、直鎖、分岐状又は環状の低級アルキル基が含まれる。低級アルキル基の炭素原子数は、低級アルキル化誘導体が抗ウイルス活性を有する限り特に制限はないが、製造の容易性、製造コスト等を考慮すると 1 ~ 4 個程度であろう。

【 0 0 4 3 】

本発明のペプチド A 1 - M A 0 2 6 において、低級アルキル化されている官能基は、低級アルキル化した誘導体が抗ウイルス活性を奏する限り特に制限はない。例えば、ペプチドを構成するアミノ酸残基が有する遊離のアミノ基やカルボキシ基が含まれる。また、低級アルキル化には、上記アミノ基の N アルキル化やカルボキシ基のエステル化が含まれるが、これに限定されるものではない。

【 0 0 4 4 】

本発明のペプチド A 1 - M A 0 2 6 の低級アルキル化誘導体の一例を挙げると、本発明のペプチド M A 0 2 6 において、グルタミン酸残基が有する遊離のカルボキシ基の低級アルキル化誘導体を挙げることができる。そのような低級アルキル化誘導体は、本発明のペプチド M A 0 2 6 を、アルキル化剤によりアルキル基を導入することにより製造することができるがこの方法に限定されるものではない。使用し得るアルキル化剤には、ジアゾメタン、ヨウ化メチル、トリメチルシリルジアゾメタン、イソブチレン、ヨウ化エチル等が含まれるがこれらに限定されない。

本発明のペプチド A 1 - M A 0 2 6 の塩には、上記本発明のペプチド M A 0 2 6 で述べたものが含まれるがそれらに限定されるものではない。

【 0 0 4 5 】

第 2 の誘導体（本発明のペプチド B T I - M A 0 2 6 ）は、本発明のペプチド M A 0 2 6 のグルタミン残基が α , γ - ジアミノ酪酸に置換したこと以外は、本発明のペプチド M A 0 2 6 と同じである。即ち、本発明のペプチド B T I - M A 0 2 6 は、構成アミノ酸残基が、 α , γ - ジアミノ酪酸 4 残基、グルタミン酸 1 残基、セリン 1 残基、バリン 2 残基、イソロイシン 1 残基およびロイシン 5 残基からなる。本発明のペプチド B T I - M A 0 2 6 の N 末端のアミノ酸残基はロイシンであり、このロイシンのアミノ基に 3 - ヒドロキシデカノイル基がアミド結合している。また、本発明のペプチド B T I - M A 0 2 6 は、環状構造を有する。この環状構造は、ペプチドを構成するアミノ酸残基のうち、セリンの水酸基とイソロイシンのカルボキシ基との間のエステル結合により形成されている。

【 0 0 4 6 】

本発明のペプチド B T I - M A 0 2 6 は、本発明のペプチド M A 0 2 6 のグルタミンの第一級カルボン酸アミドをホフマン転位反応により、第一級アミンに変換し、製造することができる。ホフマン転位反応には、[I , I - ビス（トリフルオロアセトキシ）ヨード] ベンゼン（以下、「 B T I 」ともいう。）などを適宜用いることができる。

本発明のペプチド B T I - M A 0 2 6 の塩には、上記本発明のペプチド M A 0

26で述べたものが含まれるがそれらに限定されるものではない。

【0047】

第3の誘導体（本発明のペプチドBTI-baseMA026）は、上記本発明のペプチドBTI-MA026の環状構造を形成するセリン残基とイソロイシン残基との間のエステル結合が加水分解され、鎖状ペプチドになったこと以外は、BTI-MA026と同じである。即ち、本発明のペプチドBTI-baseMA026は、構成アミノ酸残基が、 α , γ -ジアミノ酪酸4残基、グルタミン酸1残基、セリン1残基、バリン2残基、イソロイシン1残基およびロイシン5残基からなる。本発明のペプチドBTI-baseMA026のN末端は、ロイシンであり、このロイシンのアミノ基に3-ヒドロキシデカノイル基がアミド結合している。本発明のペプチドBTI-baseMA026には環状構造はなく、鎖状ペプチド誘導体である。

【0048】

セリン残基およびイソロイシン残基間のエステル結合の加水分解反応は、例えば、アルカリ加水分解により行うことができる。使用し得る塩基としては、ジメチルアミン、ジエチルアミン、水酸化ナトリウム、アンモニア、ナトリウムメトキシドなどを挙げることができる。

本発明のペプチドBTI-baseMA026の塩には、上記本発明のペプチドMA026で述べたものが含まれるがそれらに限定されるものではない。

【0049】

次に、本発明の抗ウイルス剤について以下に詳細に説明する。

本発明の*Pseudomonas*属に属する新種の菌株および本発明のRtIB026株；本発明のペプチド（MA026、R1MA026およびR2MA026）および本発明のペプチドMA026の誘導体（A1-MA026、BTI-MA026およびBTI-baseMA026）並びにそれらの塩は、それぞれ単独で又は組み合わせて抗ウイルス剤の有効成分として使用することができる。本発明のペプチドおよびペプチド誘導体の塩を抗ウイルス剤の有効成分として用いる場合、その塩には上記本発明のペプチドMA026の塩として言及したものが含まれるが、薬学的に許容し得る塩であればそれらに限定されない。

【 0 0 5 0 】

本明細書において、抗ウイルス剤とは、対象とする動物（ヒトを含む）がウイルスに感染することを予防し、ウイルスに感染した動物を治療し得る作用を有するものが含まれる。本発明の抗ウイルス剤が有効な動物には、哺乳類（ヒトを含む）、魚類および甲殻類が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 1 】

本発明の抗ウイルス剤が対象とし得るウイルスには、次のウイルスが含まれる。

【 0 0 5 2 】

・脂質膜を有するウイルス。ここで、脂質膜とは、エンベロープと呼ばれるウイルス外膜の他に、ウイルス粒子内膜も含まれる。

このようなウイルスには、ラブドウイルス、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、イリドウイルス、レトロウイルス、オルソミクソウイルス、フラビウイルス、ヘパドナウイルス、フィロウイルスが含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 5 3 】

これらの脂質膜を有するウイルスの宿主には、哺乳類（例えば、ヒト、ウシ、イヌ、ネコ、ブタ）、鳥類（例えば、ニワトリ）、魚類（例えば、ニジマス、サケ、ウナギ、アナゴ、マダイ、ブリ）、甲殻類（例えば、エビ）等が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 5 4 】

宿主を哺乳類とする脂質膜を有するウイルスとしては、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、インフルエンザウイルス、C型肝炎ウイルス、デング熱ウイルス、B型肝炎ウイルス、エボラウイルス、単純ヘルペスウイルス、Epstein Barrウイルス等が含まれるがこれらに限定されない。宿主を魚類、甲殻類とする脂質膜を有するウイルスとしては、サケ科魚類の伝染性造血器壊死症原因ウイルス（IHNV）、アメリカウナギのラブドウイルス（EVA）、ヨーロッパウナギのラブドウイルス（EVEX）、エビYHD（yellow head disease）、サケ科魚類のOMV、ウナギEHV、エビPRDV、マダイRSIV等が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 5 5 】

- ・ 一本鎖RNAをゲノムとして有するウイルス。

このようなウイルスには、ラブドウイルス、レトロウイルス、オルソミクソウイルス、ヘパトウイルス、フラビウイルス、フィロウイルスが含まれるがこれらに限定されない。これらの1本鎖RNAをゲノムとして有するウイルスの宿主には、哺乳類、鳥類、魚類、甲殻類等が含まれ、これらのウイルスの宿主の具体的な動物およびそれらを宿主とする具体的なウイルスは上述したものが含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 5 6 】

- ・ 二本鎖DNAをゲノムとして有するウイルス。

このようなウイルスには、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、イリドウイルス、ヘパドナウイルスが含まれるがこれらに限定されない。これらの二本鎖DNAをゲノムとして有するウイルスの宿主には、哺乳類、鳥類、魚類、甲殻類等が含まれ、これらのウイルスの宿主の具体的な動物およびそれらを宿主とする具体的なウイルスは上述したものが含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 5 7 】

本発明の抗ウイルス剤の投与方法および投与形態は、有効成分が投与対象において抗ウイルス活性を発揮し得るものであれば特に制限はない。

例えば、本発明のRtIB026株は、経口投与することができる。本発明のRtIB026株を魚類、甲殻類に経口投与する場合には、餌料に混合したり、カニューレ法により強制的に投与することができる。また、RtIB026株は、何れの養魚餌料にも添加することができる。餌料に混合する場合、RtIB026株の凍結乾燥粉末を肝油等に分散させたものを餌料に添加することもできる。

【 0 0 5 8 】

添加量は、対象とする動物の種類、動物の生活環境、対象とするウイルスの種類、疾病の程度等に応じて当業者であれば適宜設定することができる。一例を挙げると、養殖池のような屋外で飼育するニジマスには、餌料1g当たり $10^4 \sim 10^8$ CFUのRtIB026株を添加することによりウイルス病の発病率を抑

え、歩留まりを上げることができる。

【 0 0 5 9 】

また、本発明の R t I B 0 2 6 株は、魚類や甲殻類に投与する場合は浸漬投与することもできるし、飼育水中で本発明の R t I B 0 2 6 株を生育させることもできる。さらに、濾過材中に本発明の R t I B 0 2 6 株を生育させ、飼育用水中のウイルスを不活化することによっても効果を奏することができる。

本発明の R t I B 0 2 6 株は、生菌の状態で動物に投与することが抗ウイルス効果の観点から好ましい。

【 0 0 6 0 】

一方、本発明のペプチド (M A 0 2 6 、 R 1 M A 0 2 6 および R 2 M A 0 2 6) および本発明のペプチド M A 0 2 6 の誘導体 (A 1 - M A 0 2 6 、 B T I - M A 0 2 6 および B T I - b a s e M A 0 2 6) 並びにそれらの塩の投与方法および投与形態も抗ウイルス活性を発揮し得るものであれば特に制限はなく、経口投与、注射等により投与することができる。魚類や甲殻類に経口投与する場合の投与形態は、上述した本発明の R t I B 0 2 6 株と同様に、餌料に混合したり、カニューレ法により強制的に投与することができる。また、浸漬投与、飼育用水中に直接投与することもできる。注射投与する場合は、例えば、生理食塩水のような通常医薬品の溶媒に用いられる溶媒に溶解させて投与することができる。

【 0 0 6 1 】

添加量は、対象とする動物の種類、体重、魚類等の場合はそれらの飼育環境、対象とするウイルスの種類、疾病の程度等に応じて当業者であれば適宜設定することができる。

【 0 0 6 2 】

【実施例】

以下に本発明の実施例を記載するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【 0 0 6 3 】

(実施例 1)

< 養殖ニジマスからの本発明の R t I B 0 2 6 株の分離 >

1. 分離源のニジマスは、山梨県内の養魚場で飼育しているニジマス（魚体重 460 g、全長 34.5 cm）であった。

2. 1のニジマスを開腹し消化管を摘出した。これを滅菌したメスで切り開き、下記に示す a) 培養液中に入れ、25℃で5日間培養を行った。

3. 2で得られた培養液の一部を下記 b) の平板培地に塗抹して培養した結果、得られたコロニーをランダムに32個釣菌した。分離コロニーを少なくとも2回、同平板培地に画線培養し、純分離を行った。

4. 分離した菌それぞれについて下記 a) の培地で25℃、5日間培養した培養上清液（菌体を濾過除菌したもの）を得た。その上清について培養細胞を用いて抗ウイルス活性を評価したところ、強い抗ウイルス活性を持つ1菌株（RtIB026株）を得た。

【0064】

抗ウイルス活性の評価は、以下に示すBurkeらの方法（Appl. Environ. Microbiol., 29, 872-876, 1980）を一部改良した方法に従い、行った。

①抗ウイルス活性測定試料をジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解した後、ハanks液で希釈する。

②①の希釈液とハanks液で希釈したウイルス液（IHNV HV7601株；100～200PFU／検体）をそれぞれ0.2mL等量で混ぜ、10℃で2時間作用させる。

③予め、24時間前から24ウェルの細胞培養用プレートに培養しておいたCHSE-214細胞に②の作用後の試料を30分間接種する。

④試料をウェルから抜き取り、0.8%のメチルセルロースを添加したMEM培地を重層して7日間培養する。

⑤培養プレート上の細胞を3.7%ホルマリン水溶液で固定し、1%クリスタルバイオレットで染色後プラーク数を計測する。

⑥抗ウイルス活性は試料未添加のウェルを基準にプラーク数の減少を割合で示す。

【0065】

(培地の組成)

a) ポリペプトン 5.00g、肉エキス 2.50g、酵母エキス 2.50g、 K_2HPO_4 0.20g、 $MgSO_4$ 0.05g、グルコース 1.00g、NaCl 5.00g、蒸留水 1000mL、pH7.5、121℃で15分間高圧滅菌

b) a) に細菌用寒天15.00gを添加。

以下の実施例において、抗ウイルス活性の評価は上記の方法で行った。

【0066】

(実施例2)

＜本発明のRtIB026株培養液からの、本発明のペプチドMA026、R1MA026およびR2MA026の精製＞

1. 培養濾液の調製；上記実施例1で得られたRtIB026株の培養は、以下の表3に示す組成の培養液を用いた。

【0067】

【表3】

表3 培地組成

| 保存塩溶液 | |
|---|---------|
| EDTA (2Na) | 2.5 g |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 10.95 g |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 5.0 g |
| MnSO ₄ · H ₂ O | 1.54 g |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.392 g |
| Co (NO ₃) ₂ · 6H ₂ O | 0.248 g |
| Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O | 0.177 g |
| 蒸留水 | 1000mL |
| ミネラル溶液 | |
| ニトリロ3酢酸 | 10 g |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 14.45 g |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 3.34 g |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O | 0.009 g |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0.1 g |
| 保存塩溶液 | 50mL |
| 蒸留水 | 950mL |
| pH6.8 (KOH)に調節 | |
| 標準ミネラルベース | |
| 0.5M Na ₂ HPO ₄ +KH ₂ PO ₄ 緩衝液 | 80mL |
| ミネラル溶液 | 20mL |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1 g |
| 蒸留水 | 950mL |
| 酵母エキス培地 | |
| 酵母エキス | 5 g |
| 標準ミネラルベース | 1000mL |

【0068】

予め斜面培養した同菌1白金耳を同培地に接種し、25℃で一晩培養したもの5mLを2.5Lの同培地に添加して25℃で5日間培養した。培養液を遠心分離し、さらにその上清を0.45μmのメンブランフィルターで濾過して除菌を

行った。培養濾液は合計20Lを1ロットとして以下の精製を行った。

【0069】

2. 培養濾液の濃縮・脱塩；1で調製した培養液をダイヤイオン HP-20SS (62.5×120mm) カラムに通液させ、精製水5Lおよび80%のメタノール水溶液(3L)で順次洗浄した。次に、95%のメタノール水溶液で目的物質を含む画分を溶出した。さらに本画分について減圧濃縮を行い、再度水に懸濁した上で再びダイヤイオン HP-20SS (95×45mm) に通液させた。以下前記と同様に精製水1Lおよび80%メタノール1Lで洗浄後、メタノールで目的物質を含む画分を溶出した。

【0070】

3. 目的物質の分離；①シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製。
2で得た画分を減圧で乾固し、以下に示した組成の溶媒少量に溶解させた。この溶液を予め同溶媒で調製したシリカゲルカラム(Wakogel C-300HG)に注入し、同溶媒で溶出および分画を行った(溶出溶媒；酢酸エチル：メタノール：水=100：25：15(v/v/v))。目的物質の検出は、薄層クロマトグラフィーで上記展開溶媒を用いて展開し、実施した(Rf=0.25を示すスポットを0.2%バニリン硫酸溶液で発色して検出を行った。)。

【0071】

②高速液体クロマトグラフィーによる精製。 上記①で得た目的物質を含む画分を減圧濃縮し、92%のメタノール水溶液に溶解させ、ODSカラム；YMC-Pack R&D ODS (20×250mm) を装着した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離を行った。分離条件は流速5.0mL/分、検出波長220nm、溶出溶媒92%メタノール水溶液で行った。このHPLCのクロマトグラムを図1に示す。

【0072】

保持時間17.7分(ピーク番号1：R1MA026画分)、19.0分(ピーク番号2：MA026画分)および21.4分(ピーク番号3：R2MA026画分)に認められる各ピークを示す画分をそれぞれ分取し、減圧濃縮した。次に濃縮した各画分を再び92%エタノール水溶液に溶解し、上記と同じ条件で再

度分取を行った。各目的物質は単一のピークを示す画分として分取し、精製を完了した。

【 0 0 7 3 】

上述した方法により得られた本発明の R t I B 0 2 6 株の培養液（1ロット、20L）から本発明のペプチドMA026、R1MA026およびR2MA026がそれぞれ50mg、1mgおよび5mg得られた。なお、本発明のペプチドMA026、R1MA026およびR2MA026の組成比は、培養条件（温度、pH、培養基組成、酸素濃度、菌の状態等）によって上述したものとは異なることがある。

【 0 0 7 4 】

（測定例101）

実施例2で精製した本発明のペプチドMA026のプロトンNMRのチャートを図2に示す。

【 0 0 7 5 】

（測定例102）

実施例2で精製した本発明のペプチドMA026のカーボンNMRのチャートを図3に示す。

【 0 0 7 6 】

（測定例103）

実施例2で精製した本発明のペプチドMA026の赤外吸収スペクトルを図4に示す。

【 0 0 7 7 】

（測定例104）

実施例2で精製した本発明のペプチドMA026のポジティブFAB-MSの質量分析チャートを図5に示す。

【 0 0 7 8 】

（測定例105）

実施例2で精製した本発明のペプチドMA026のネガティブFAB-MSの質量分析チャートを図6に示す。

【 0 0 7 9 】

(測定例 1 0 6)

実施例 2 で精製した本発明のペプチド MA 0 2 6 について高分解能質量分析を行った。実測値：1 7 7 6 . 0 8 2 9 (M+H)⁺を基に、推定される分子式は、C₈₄H₁₄₆O₂₃N₁₈であった。この分子式から計算される分子量は、1 7 7 5 . 0 8 1 1 である。

【 0 0 8 0 】

(測定例 1 0 7)

実施例 2 で精製した本発明のペプチド MA 0 2 6 の元素分析を行い、以下の表 4 に示す結果を得た。

【 0 0 8 1 】

【表 4】

| 表 4 | | | |
|-----------|-------|------|-------|
| | C % | H % | N % |
| 分析値 | 55.04 | 8.17 | 13.75 |
| (2 回の測定値) | 54.97 | 8.17 | 13.75 |
| 理論値 | 56.80 | 8.29 | 14.19 |

特記事項：吸湿性あり
灰分あり

【 0 0 8 2 】

(測定例 1 0 8)

実施例 2 で精製した本発明のペプチド MA 0 2 6 の融点を測定し、1 7 4 ~ 1 8 0 °C を得た。

【 0 0 8 3 】

(測定例 1 0 9)

実施例 2 で精製した本発明のペプチド MA 0 2 6 の比旋光度を測定し、 $[\alpha]_D^{17} - 29.5^\circ$ (c 1.0, MeOH) を得た。

【 0 0 8 4 】

(測定例 1 1 0)

実施例 2 で精製した本発明のペプチド MA 0 2 6 のアミノ酸分析結果を図 7 に

示す。

アミノ酸分析は、本発明のペプチドMA026を6N塩酸を用いて110℃、24時間加水分解処理を行い、アミノ酸分析計で分析した。なお、以下の測定例における酸加水分解処理はいずれも本測定例110での酸加水分解条件で行った。

【0085】

(測定例111)

本発明のペプチドMA026のホフマン転位反応物(本発明のペプチドBTI-MA026)を以下の方法で分析した。

本発明のペプチドMA026とビストリフルオロアセトキシヨードベンゼン(BTI)10mg/mLを50%アセトニトリル水溶液中で60℃窒素気流下にて4時間反応した。

反応物から未反応のBTIをジエチルエーテルで除去し、ゲル濾過法(セファデックス LH-20カラム、10×180mm、メタノール溶液)により反応産物を精製した。

反応精製物の一部(1.8mg)を酸加水分解し、アミノ酸分析計で分析した。

ホフマン転位前後のアミノ酸組成計算値を以下の表5に示す。

【0086】

【表5】

表5

| | Ser | Glx | Val | Ile | Leu |
|-----|------|------|------|------|------|
| 反応前 | 0.80 | 4.96 | 1.93 | 0.90 | 5.00 |
| 反応後 | 0.78 | 0.99 | 2.00 | 0.90 | 5.00 |

【0087】

上記表5に示す反応前後の結果を比較すると、本発明のペプチドMA026のグルタミン残基数とグルタミン酸残基数の比率は、4:1であることが推定される。

また、本発明のペプチドBTI-MA026の構成アミノ酸は、 α 、 γ -ジア

ミノ酪酸 4 残基、グルタミン酸 1 残基、セリン 1 残基、バリン 2 残基、イソロイシン 1 残基およびロイシン 5 残基であることが推定される。

【0088】

(測定例 112)

本発明のペプチド MA026 と水素化ホウ素リチウム (LiBH_4) をメタノール溶液中で室温にて 20 時間反応した。

反応物を 0.1 N 塩酸で中和し、過剰量の水を加えブタノールで抽出した。

反応抽出物の一部 (2.0 mg) を酸加水分解し、アミノ酸分析計で分析した。

得られたアミノ酸組成計算値を以下の表 6 に示す。

【0089】

【表 6】

表 6

| | Ser | Glx | Val | Ile | Leu |
|-----|------|------|------|------|------|
| 反応前 | 0.82 | 5.50 | 1.99 | 0.88 | 5.00 |
| 反応後 | 0.85 | 5.06 | 1.95 | 0.16 | 5.00 |

【0090】

上記表 6 に示す結果から、本発明のペプチド MA026 の環状構造を形成しているエステル結合のカルボキシ側のアミノ酸残基は、イソロイシンであることが推定される。

【0091】

(測定例 113)

①本発明のペプチド MA026 を、酢酸 3 mL 中に CrO_3 100 mg およびピリジン 0.1 mL を含む溶液と、室温にて 20 時間反応した。

反応物に過剰の水を加えブタノールで抽出した。

反応抽出物の一部 (4.5 mg) を酸加水分解し、アミノ酸分析計で分析した。

【0092】

②別途、本発明のペプチド MA026 を 50% ジメチルアミン水溶液に溶解し

、室温で3時間反応した。

反応物を減圧乾燥後、上記①と同様にC r O₃酸化反応を行い反応物を得た。

反応物の一部（6. 8 m g）を酸加水分解し、アミノ酸分析計で分析した。

得られた各アミノ酸組成計算値を以下の表7に示す。

【0093】

【表7】

表 7

| | Ser | Glx | Val | Ile | Leu |
|-------|------|------|------|------|------|
| ①の反応前 | 0.82 | 5.50 | 1.99 | 0.88 | 5.00 |
| ①の反応後 | 0.72 | 4.65 | 1.89 | 0.82 | 5.00 |
| ②の反応後 | 0.37 | 4.73 | 1.90 | 0.86 | 5.00 |

【0094】

上記表7に示す結果から、本発明のペプチドMA026の環状構造を形成するエステル結合のヒドロキシ側のアミノ酸残基は、セリンであることが推定される。

【0095】

（測定例114）

本発明のペプチドBTI-MA026をメタノールに溶解させ、等量のジエチルエーテルと混合した。

エーテル中に捕集したジアゾメタンを過剰量加え、1時間密閉下室温で反応した。

反応物を減圧乾燥させ、高速液体クロマトグラフィーで分離精製した。分離条件は流速5. 0 mL/分、検出波長220 nm、展開溶媒は92%メタノール水溶液で行った。

精製物を上記測定例112と同様に水素化ホウ素リチウムの還元反応を行った。

反応物の一部（0. 1 m g）を酸加水分解し、アミノ酸分析を行った。

得られたアミノ酸組成計算値を以下の表8に示す。

【0096】

【表 8】

表 8

| | Ser | Glx | Val | Ile | Leu |
|-----|------|------|------|------|------|
| 反応前 | 0.80 | 4.96 | 1.93 | 0.90 | 5.00 |
| 反応後 | 0.75 | 4.20 | 1.84 | 0.19 | 5.00 |

【0097】

上記表 8 の結果から、本発明のペプチド B T I - M A 0 2 6 のグルタミン酸が唯一の遊離のカルボキシ基を有していることが推定される。

【0098】

(測定例 1 1 5 および 1 1 6)

本発明のペプチド M A 0 2 6 を 9 4 ° C、1 4 時間、6 N H C l の条件で酸加水分解したものについてジエチルエーテルで抽出した。

抽出物を測定例 1 1 4 と同様にジアゾメタンでメチル化した。

メチル化物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して得られたフラクションのうち、薄層クロマトグラフィー {展開溶媒：酢酸エチル／メタノール／水 = 1 0 0 : 2 5 : 1 5 (v / v / v)} で R f = 0. 5 1 を示すものを分取した。この分取したものについて ^1H および ^{13}C 核磁気共鳴スペクトルを測定し、以下の結果を得た。

【0099】

^1H NMR (400MHz, CDCl_3 +TMS, Δ ppm)

0.88 (3H, t, J=6.9, H10)、0.94 (3H, d, J=6.3, H6')、0.95 (3H, d, J=6.1, H5')、1.28 (10H, br, H5~9)、1.39~1.46 (1H, m, H4a)、1.50~1.58 (2H, m, H4b&H3' a)、1.60~1.69 (2H, m, H4' &H3' b)、2.30 (1H, dd, J=8.7&15.3, H2a)、2.43 (1H, dd, J=2.8&15.3, H2b)、3.74 (3H, s, Me)、3.99 (1H, m, H2)、4.65 (1H, td, J=4.9&8.7, H2')、6.13 (1H, d, J=8.2, NH)

【0100】

^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3 +TMS, Δ ppm)

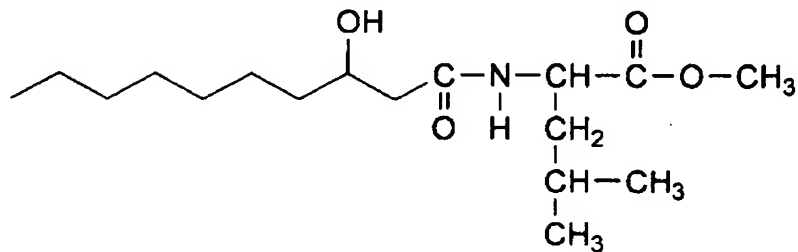
14.1 (C10)、21.9 (C6')、22.6 (C9)、22.8 (C5')、24.9 (C4')、25.5

(C5)、29.2 (C7)、29.5 (C6)、31.8 (C8)、36.7 (C4)、41.5 (C3')、42.4 (C2)、50.6 (C2')、52.4 (Me)、68.6 (C3)、172.2 (C1)、173.6 (C1')

【0101】

これらのデータから、酸加水分解物の構造を以下のように決定した。

【化1】



【0102】

この結果から、本発明のペプチドMA026のN末端のアミノ酸残基がロイシンであり、このロイシンに3-ヒドロキシデカノイル基がアミド結合していることが推定される。

【0103】

(測定例201)

実施例2のピーク番号1の画分を精製して得られた本発明のペプチドR1MA026のアミノ酸分析を上記測定例110と同様に行い、図8に示す結果を得た。

【0104】

この結果から、本発明のペプチドR1MA026の構成アミノ酸は、グルタミンおよびグルタミン酸の総数が5残基、セリン1残基、バリン3残基、並びにロイシン5残基であることが推定される。

【0105】

(測定例301)

実施例2のピーク番号3の画分を精製して得られた本発明のペプチドR2MA026のアミノ酸分析を上記測定例110と同様に行い、図9に示す結果を得た。

【0106】

この結果から、本発明のペプチド R 2 M A 0 2 6 の構成アミノ酸は、グルタミンおよびグルタミン酸の総数が 5 残基、セリン 1 残基、バリン 2 残基、イソロイシン 1 残基並びにロイシン 5 残基であることが推定される。

【0107】

(実施例 3)

本発明のペプチド M A 0 2 6 についてジメチルホルムアミド溶液中 N a H C O₃ 存在下でヨードメタンを反応させ、メチル化することにより本発明のペプチド A 1 - M A 0 2 6 を合成した。

反応物を抽出および脱水後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製した。

精製物について重メタノール溶液中のプロトン核磁気共鳴スペクトルの測定および質量分析 (F A B - M S) を行った。

図 1 0 にプロトン N M R のチャートを、図 1 1 にポジティブ F A B - M S のチャートを、図 1 2 にネガティブ F A B - M S のチャートを示す。

【0108】

(実施例 4)

<本発明の R t I B 0 2 6 株の投与試験 1>

実施例 1 で得られた本発明の R t I B 0 2 6 株をニジマス餌料に混合して経口的に投与を行うことによりサケ科魚類の伝染性造血器壊死症原因ウイルス (I H N V) に対する抵抗性を評価し、養殖魚病ウイルスの感染予防効果を検討した。試験は、室内のプラスチック水槽 (1 0 L) 内で行った。

【0109】

孵化後 1 カ月齢のニジマス稚魚 (魚体重 1 g、全長 3 c m) 6 0 尾をランダムに 3 0 尾ずつ 2 群に分けてそれぞれを 1 0 ° C で飼育し、投与群については R t I B 0 2 6 株 1 0⁷ C F U / 餌料 1 g を含む餌料を、対照群には通常の餌料を 1 日 1 回、2 週間投与した。投与終了時に 1 0 0 P F U / m L の I H N V 液に 1 時間浸漬してウイルスに感染させ、引き続き両群とも通常の餌料を投与して飼育し、その後の経過を観察した。

【 0 1 1 0 】

その結果を図 1 3 に示す。図 1 3 から明らかなように、I H N V 感染後、4 日目までは投与群と対照群ともに生存率の低下は認められなかった。5 日目以降、対照群の生存率が投与群よりも低くなり始め、9 日目から生存率の差が大きくなり、ウイルス感染後 2 3 日間で対照群の生存率は 2 0 % になったのに対し、投与群は約 7 0 % 生存しており、ウイルス病発病の予防が顕著であった。

【 0 1 1 1 】

(参考例 1)

上記実施例 1 で得られた本発明の R t I B 0 2 6 株をホルマリン処理し不活化した後、遠心分離により集めて生理的食塩水で洗浄した菌体を餌料に添加した群を追加し、実施例 3 に記載した本発明の R t I B 0 2 6 株の投与試験 1 と同様の試験を行った。

その結果、不活性な菌体を投与した場合のウイルス感染後 2 3 日での生存率は 1 6 . 7 % であり、ウイルス感染の予防効果は認められなかった。

【 0 1 1 2 】

(実施例 5)

＜本発明のペプチド M A 0 2 6 の抗ウイルス活性測定＞

サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス (I H N V) 、アメリカウナギのラブドウイルス (E V A) およびヨーロッパウナギのラブドウイルス (E V E X) に対する本発明のペプチド M A 0 2 6 の抗ウイルス活性を上述した方法により測定した。

得られた結果を図 1 4 に示す。

図 1 4 に示すように、本発明のペプチド M A 0 2 6 は、I H N V 、E V A および E V E X に対する高い抗ウイルス活性を有することが分かる。

【 0 1 1 3 】

(実施例 6)

実施例 5 と同様の方法で、本発明のペプチド R 1 M A 0 2 6 および R 2 M A 0 2 6 の I H N V に対する抗ウイルス活性を測定し、抗ウイルス活性を確認した。

図 1 5 に結果を示す。

【0114】

(実施例7)

実施例5と同様の方法で、本発明のペプチドA1-MA026、BTI-MA026およびBTI-baseMA026のIHNVに対する抗ウイルス活性を測定し、抗ウイルス活性を確認した。

図16に結果を示す。

【0115】

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、実施例1の菌株の培養液の高速液体クロマトグラムである。

【図2】

図2は、実施例2で得られた本発明のペプチドMA026のプロトンNMRのチャートである。

【図3】

図3は、実施例2で得られた本発明のペプチドMA026のカーボンNMRのチャートである。

【図4】

図4は、本発明のペプチドMA026の赤外吸収スペクトルである。

【図5】

図5は、実施例2で得られた本発明のペプチドMA026のポジティブFAB-MSの質量分析チャートである。

【図6】

図6は、実施例2で得られた本発明のペプチドMA026のネガティブFAB-MSの質量分析チャートである。

【図7】

図7は、実施例2で得られた本発明のペプチドMA026のアミノ酸分析チャートである。

【図8】

図8は、本発明のペプチドR1MA026のアミノ酸分析チャートである。

【図 9】

図 9 は、本発明のペプチド R 2 M A 0 2 6 のアミノ酸分析チャートである。

【図 1 0】

図 1 0 は、実施例 3 で得られた本発明のペプチド A 1 - M A 0 2 6 のプロトン NMR のチャートである。

【図 1 1】

図 1 1 は、実施例 3 で得られた本発明のペプチド A 1 - M A 0 2 6 のポジティブ F A B - M S の質量分析チャートである。

【図 1 2】

図 1 2 は、実施例 3 で得られた本発明のペプチド A 1 - M A 0 2 6 のネガティブ F A B - M S の質量分析チャートである。

【図 1 3】

図 1 3 は、本発明の R t I B 0 2 6 株の投与試験結果を示すグラフである。

【図 1 4】

図 1 4 は、本発明のペプチド M A 0 2 6 の抗ウイルス活性を示すグラフである。

【図 1 5】

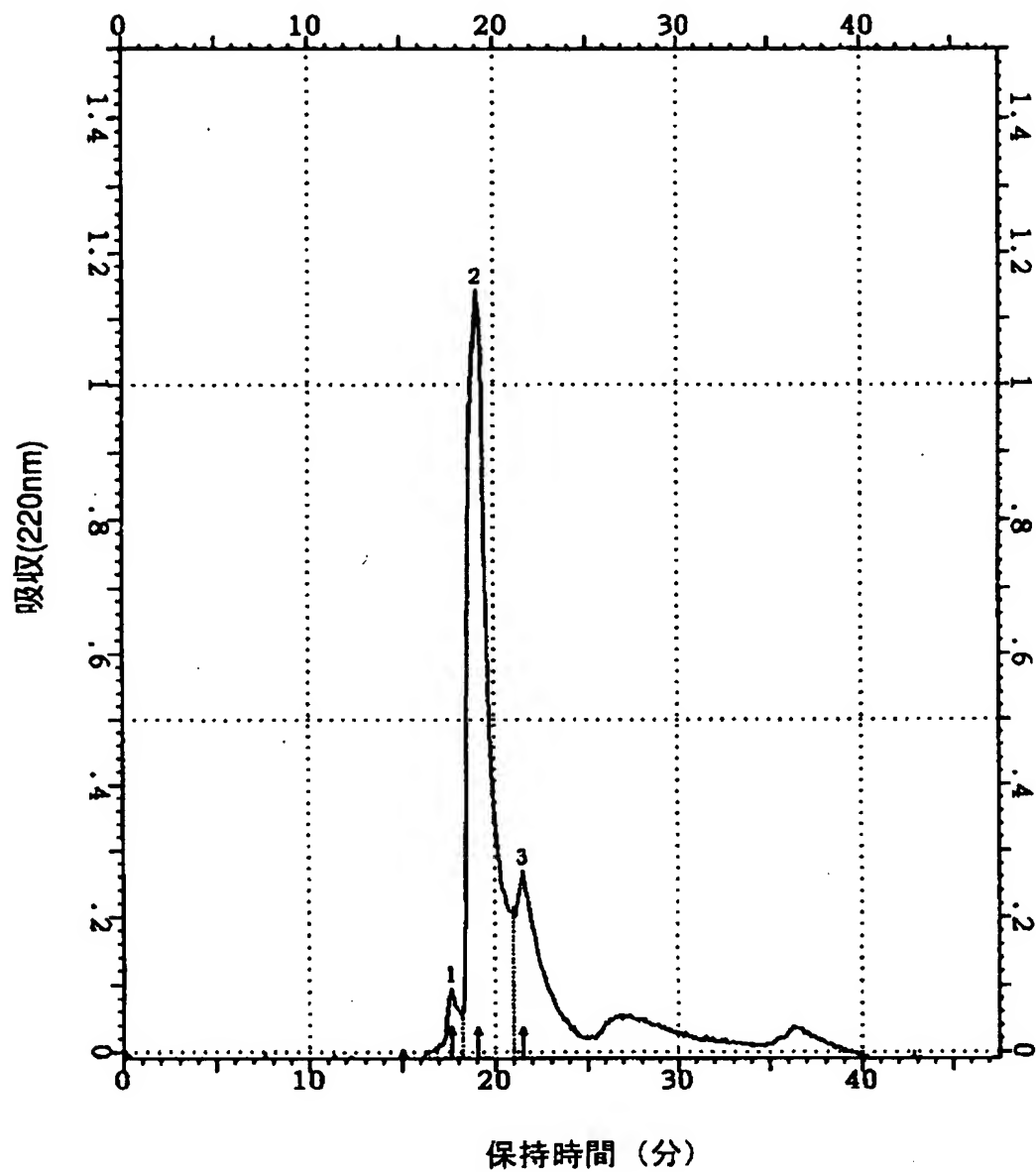
図 1 5 は、本発明のペプチド R 1 M A 0 2 6 および R 2 M A 0 2 6 の抗ウイルス活性を示すグラフである。

【図 1 6】

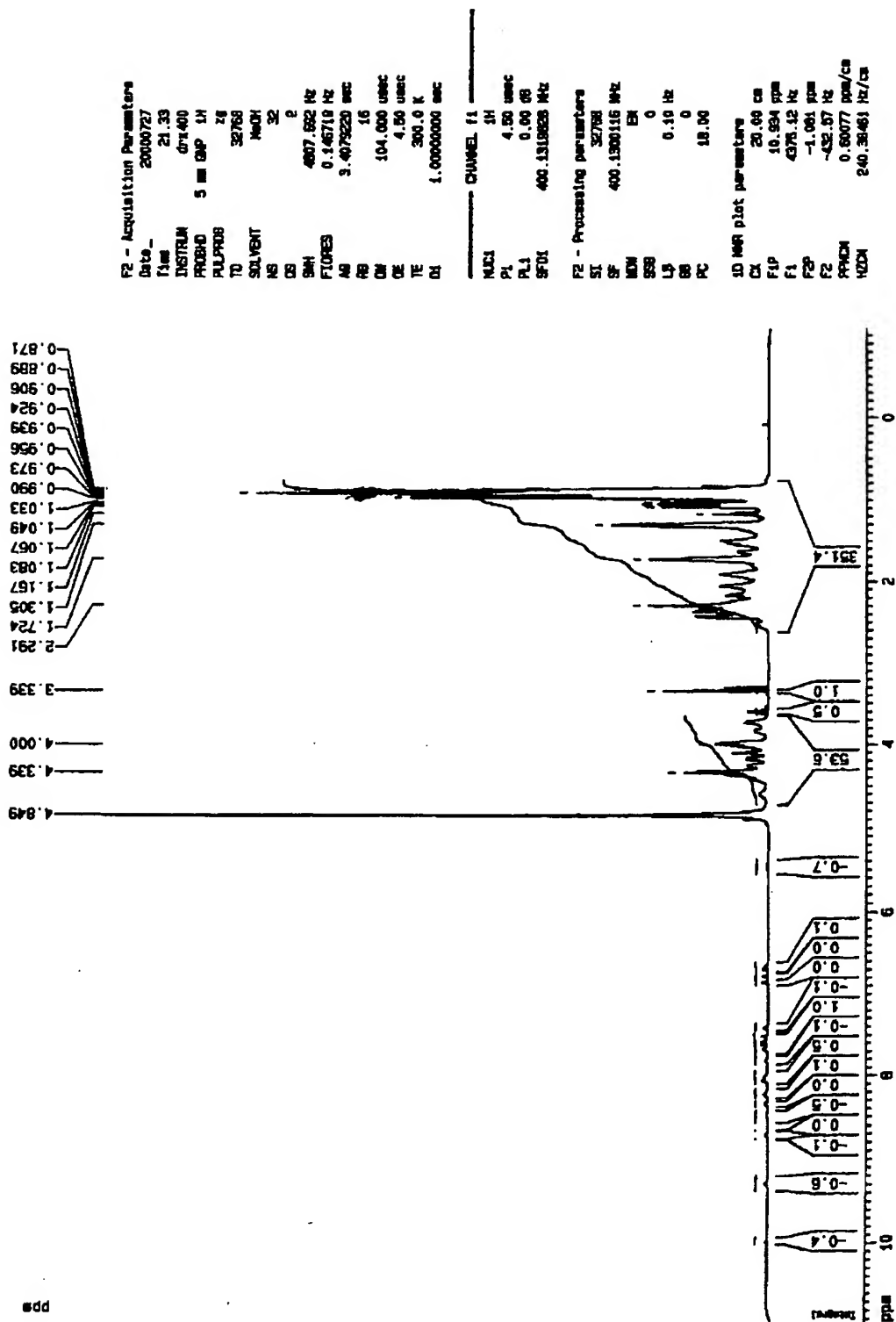
図 1 6 は、本発明のペプチド A 1 - M A 0 2 6、B T I - M A 0 2 6 および B T I - b a s e M A 0 2 6 の抗ウイルス活性を示すグラフである。

【書類名】 図面

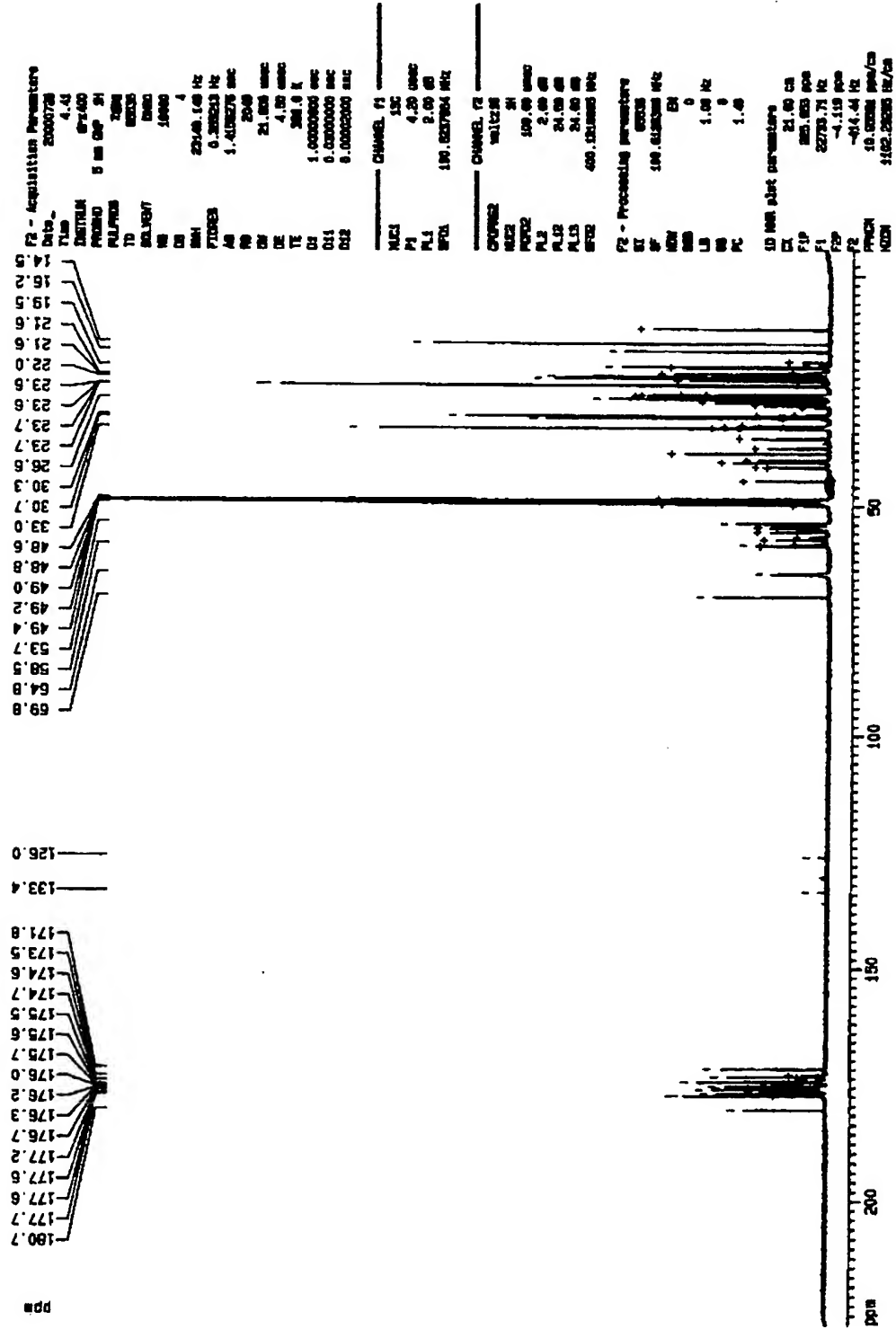
【図 1】



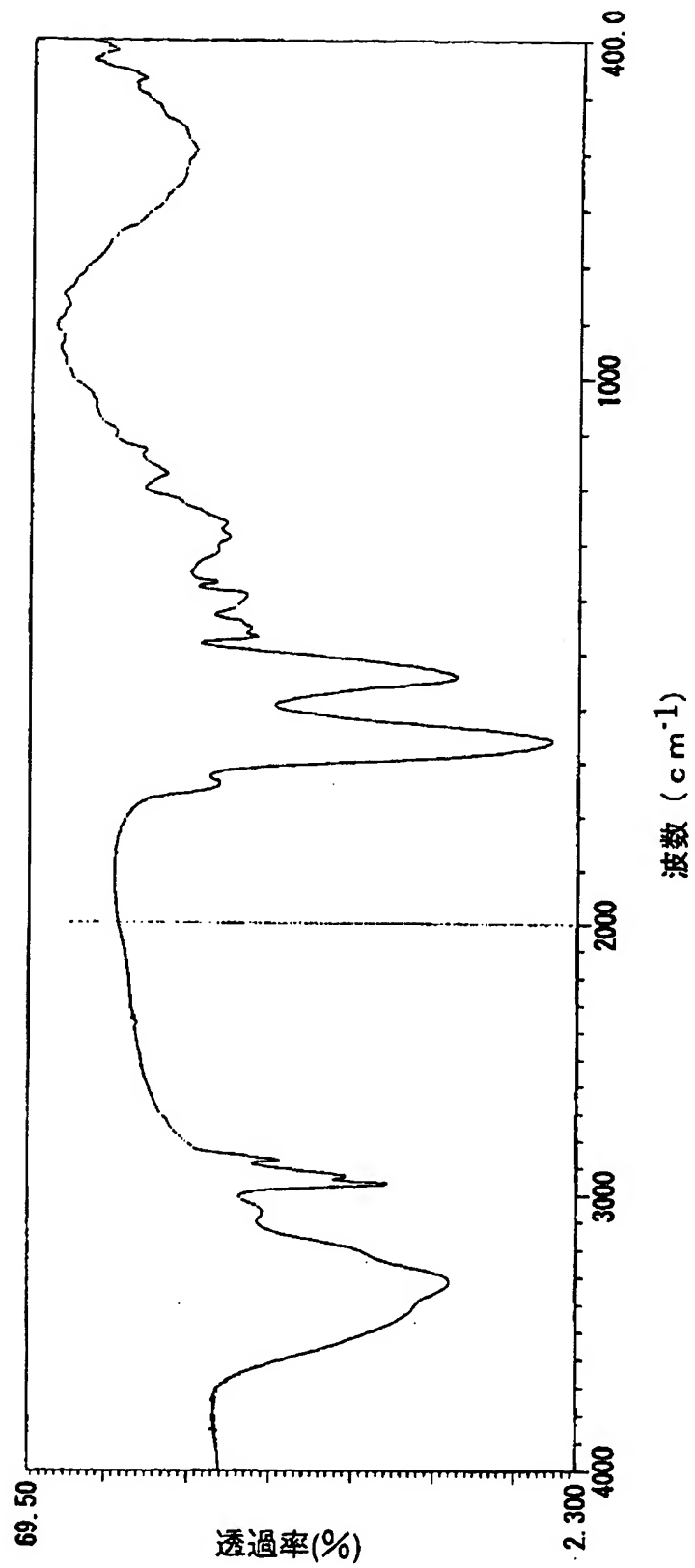
【図 2】



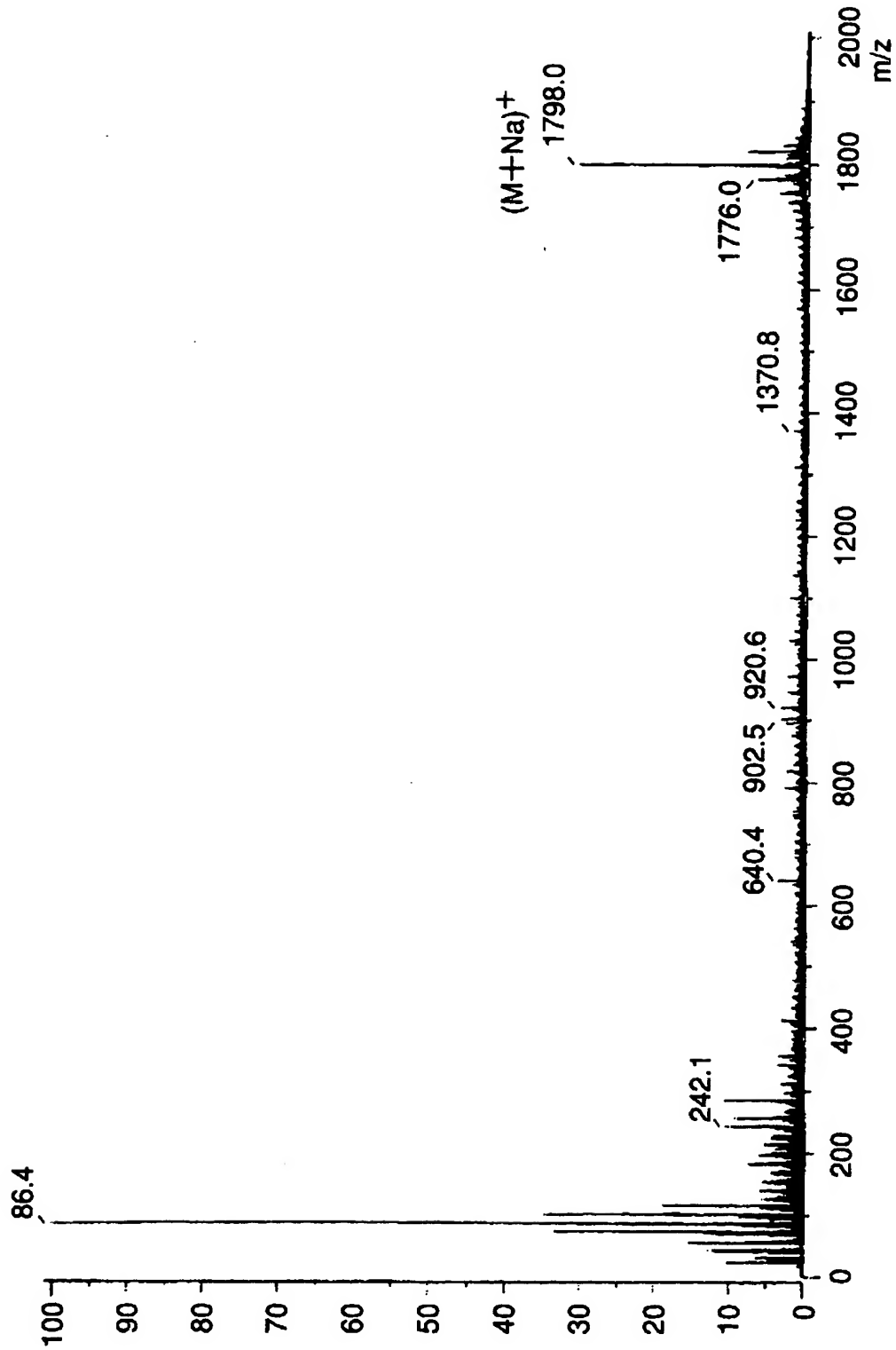
【図 3】



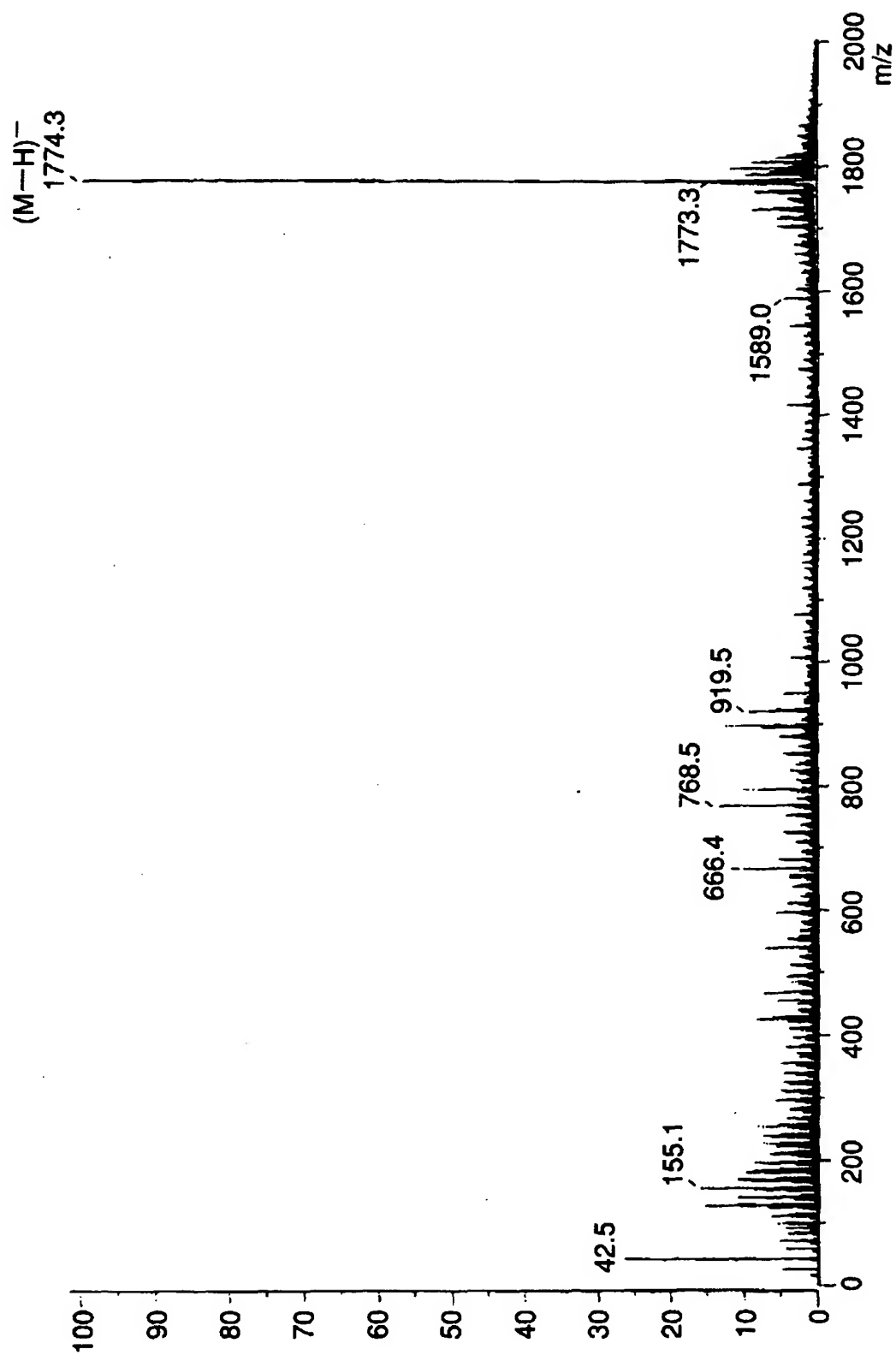
【図4】



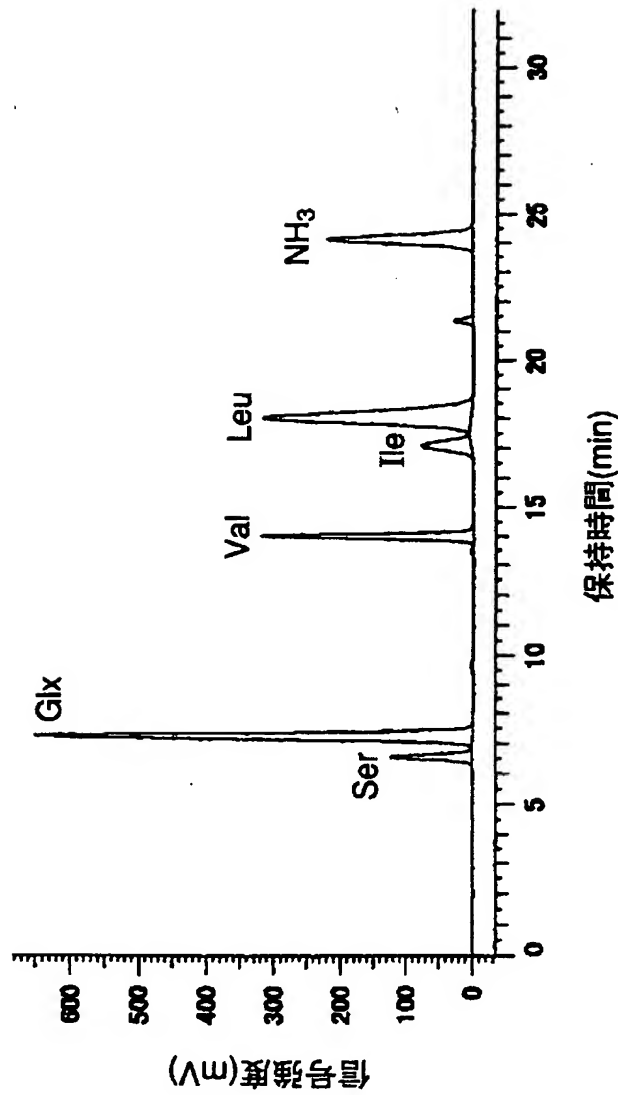
【図 5】



【図 6】



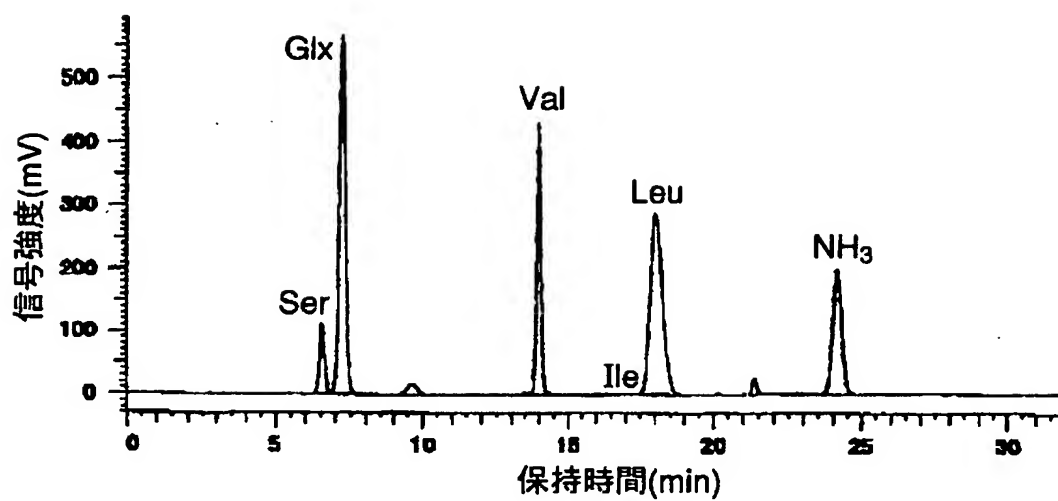
【図 7】



MA0267ミノ酸組成の計算値

| | Ser | Glx | Val | Ile | Leu |
|-------|------|------|------|------|------|
| MA026 | 0.80 | 4.96 | 1.93 | 0.90 | 5.00 |

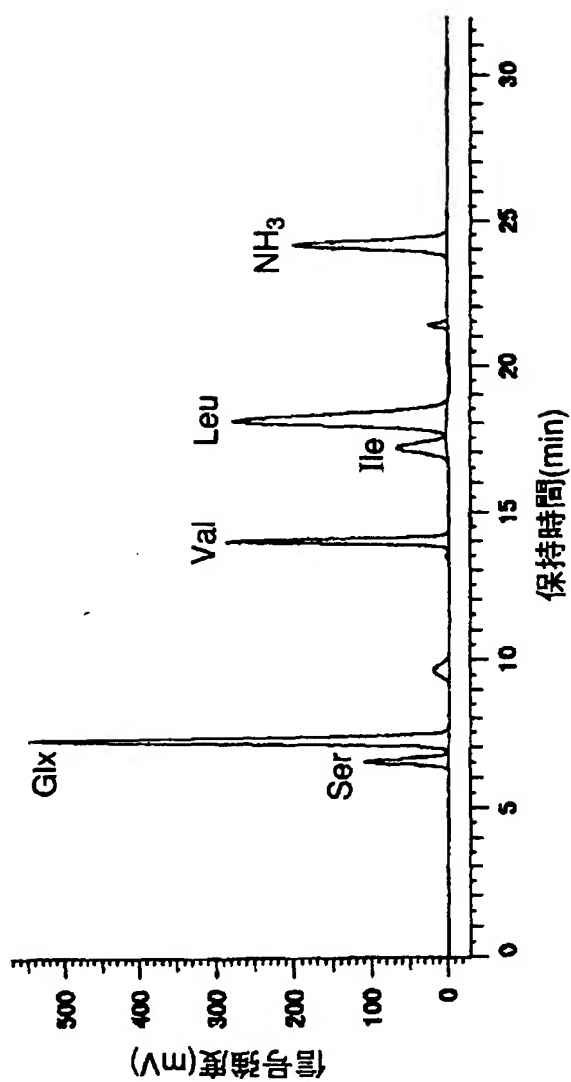
【図8】



R1MA026アミノ酸組成の計算値

| | Ser | Glx | Val | Ile | Leu |
|---------|------|------|------|------|------|
| R1MA026 | 0.79 | 4.63 | 2.75 | 0.00 | 5.00 |

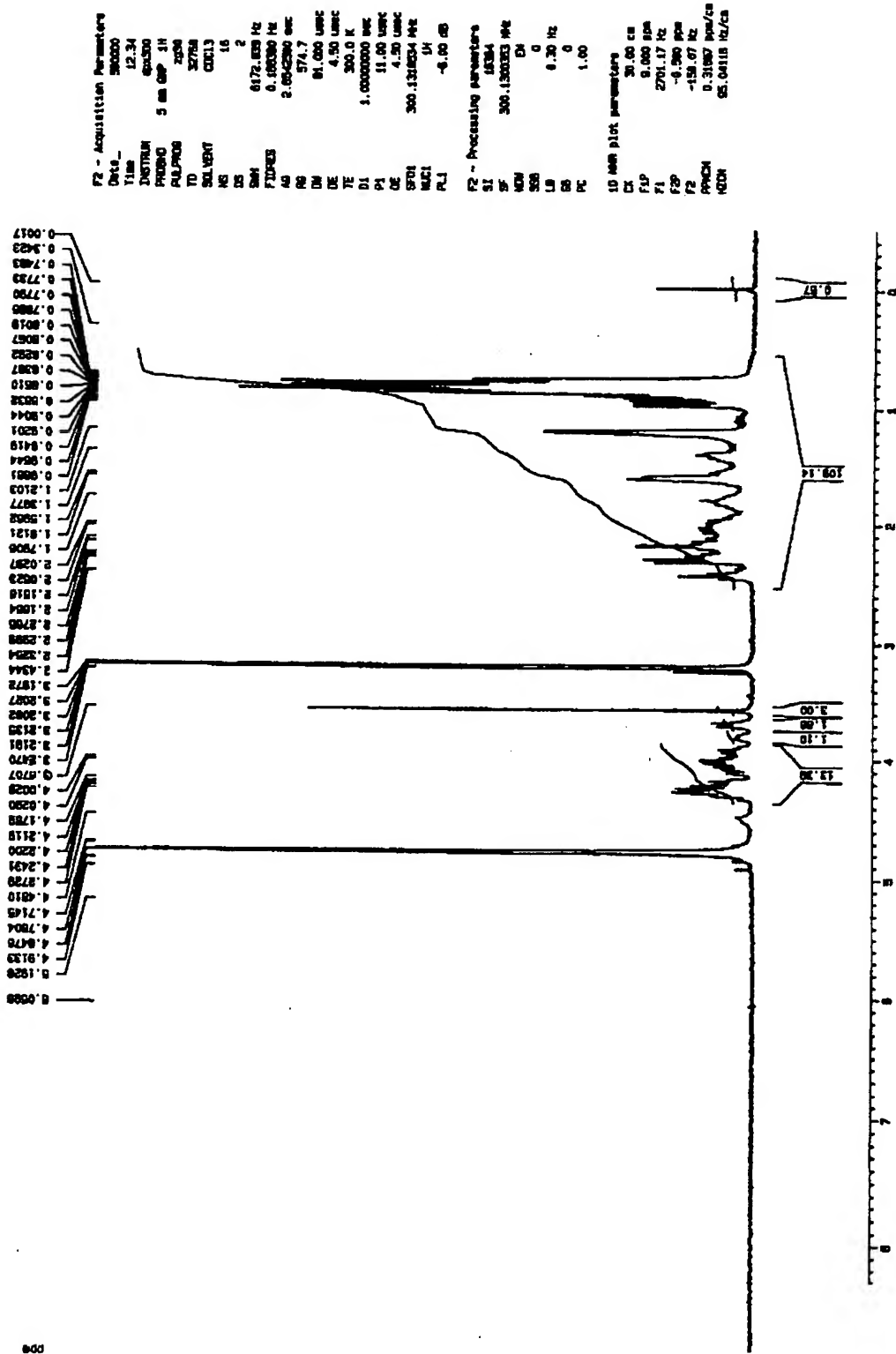
【図 9】



R2MA026 アミノ酸組成の計算値

| | Ser | Glx | Val | Ile | Leu |
|---------|------|------|------|------|------|
| R2MA026 | 0.80 | 4.66 | 1.95 | 0.92 | 5.00 |

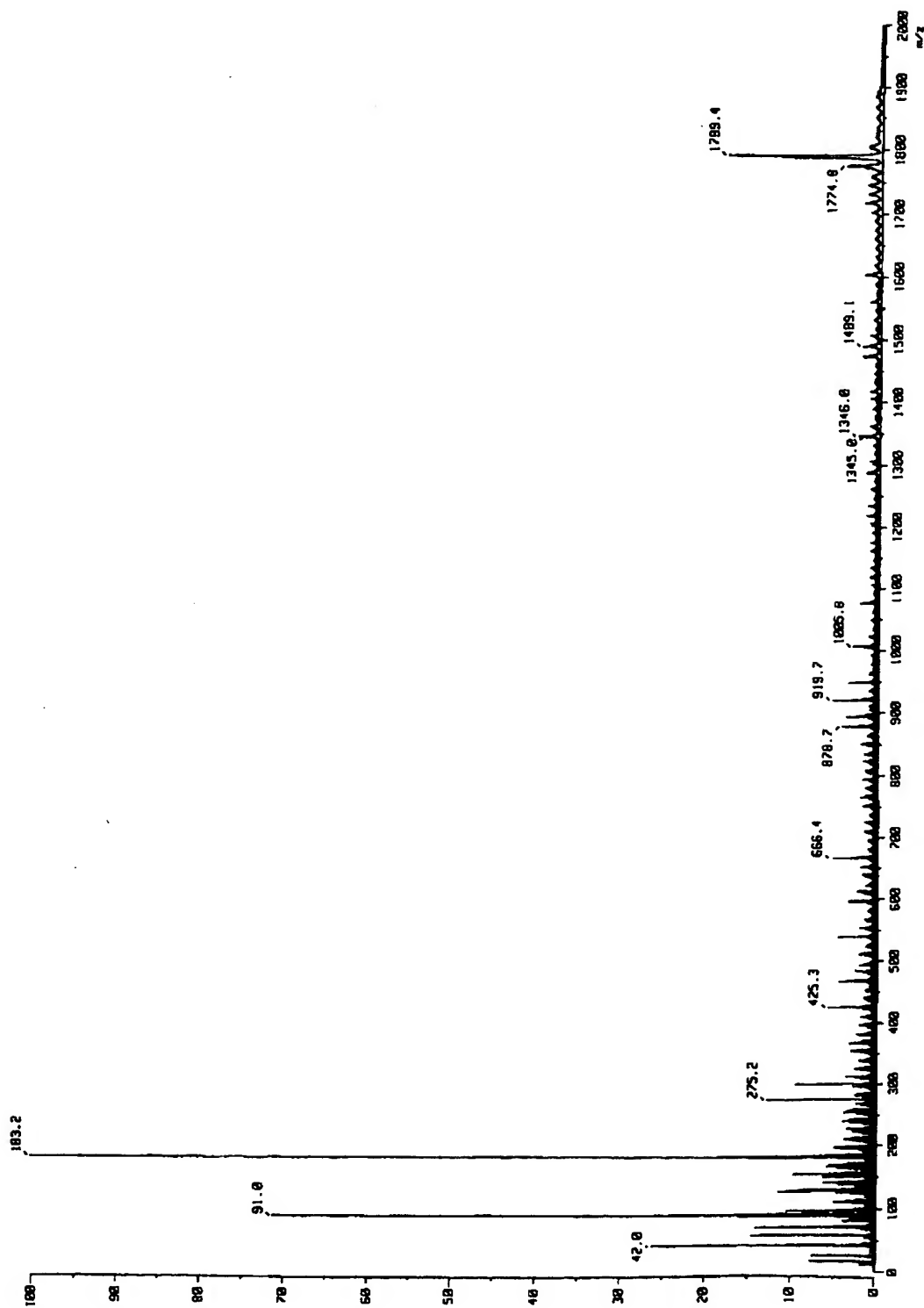
【図 10】



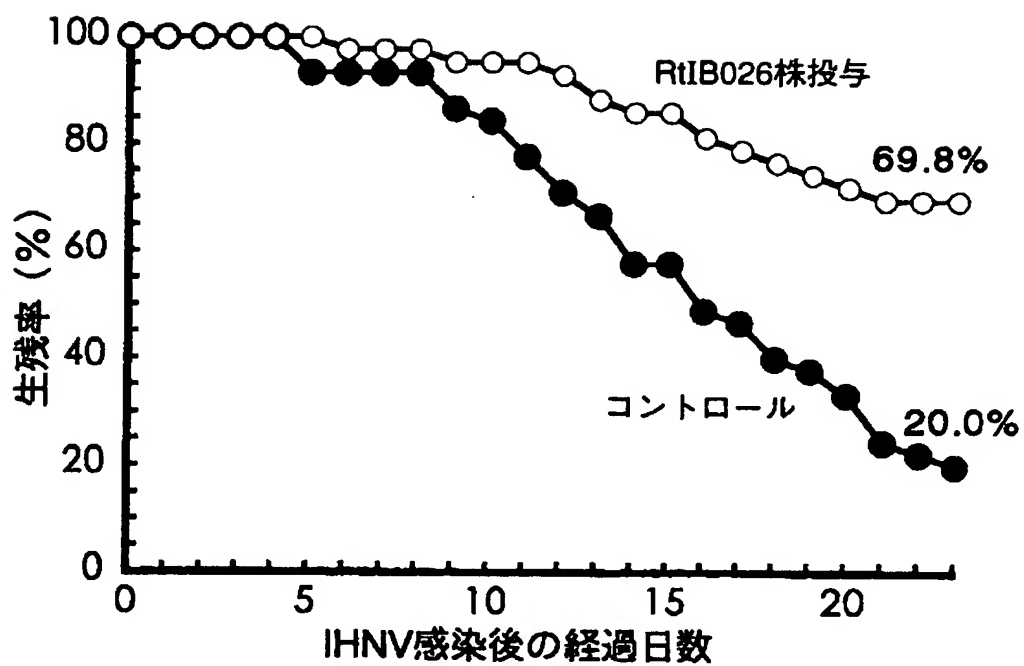
【図 11】



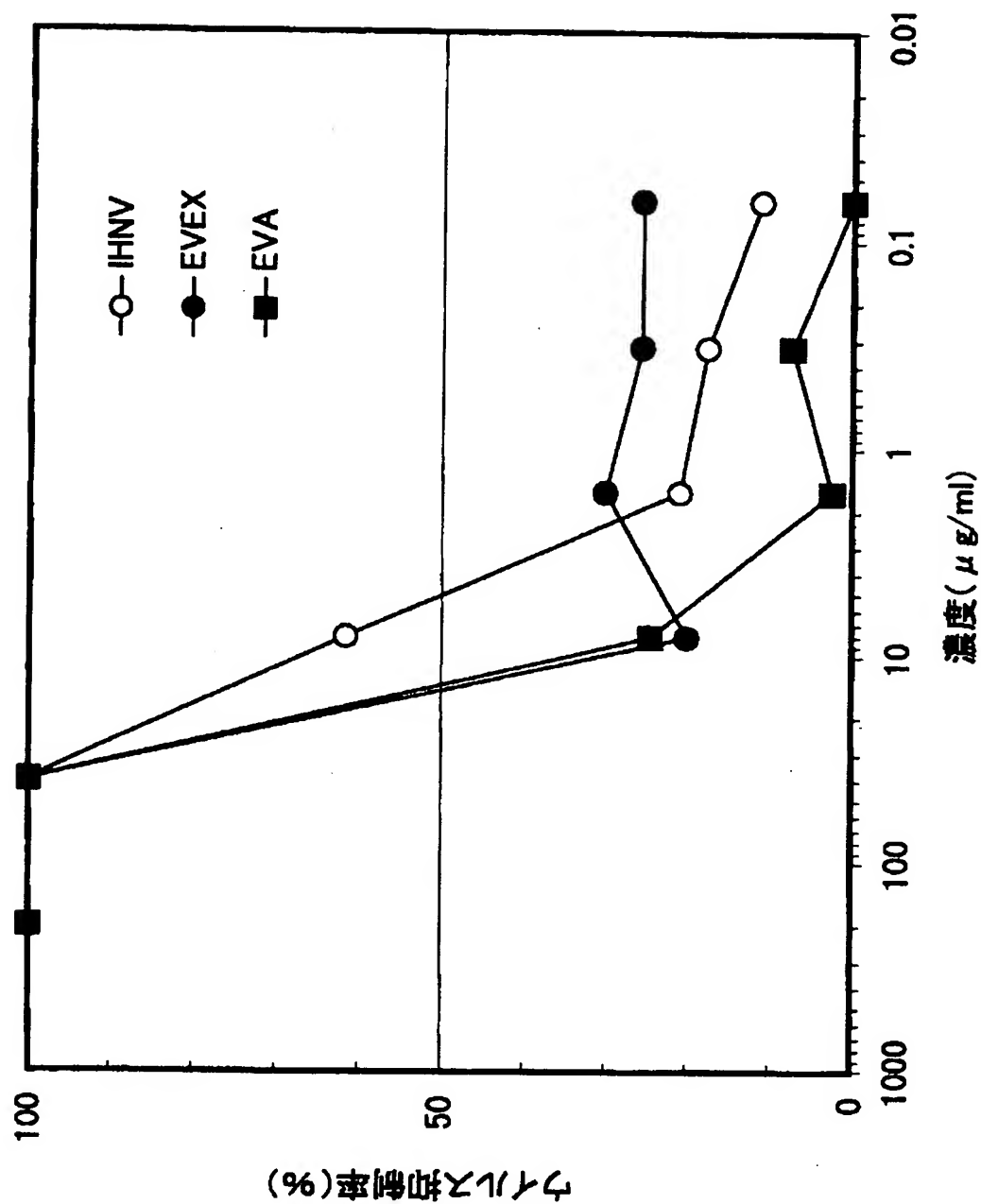
【図 1 2】



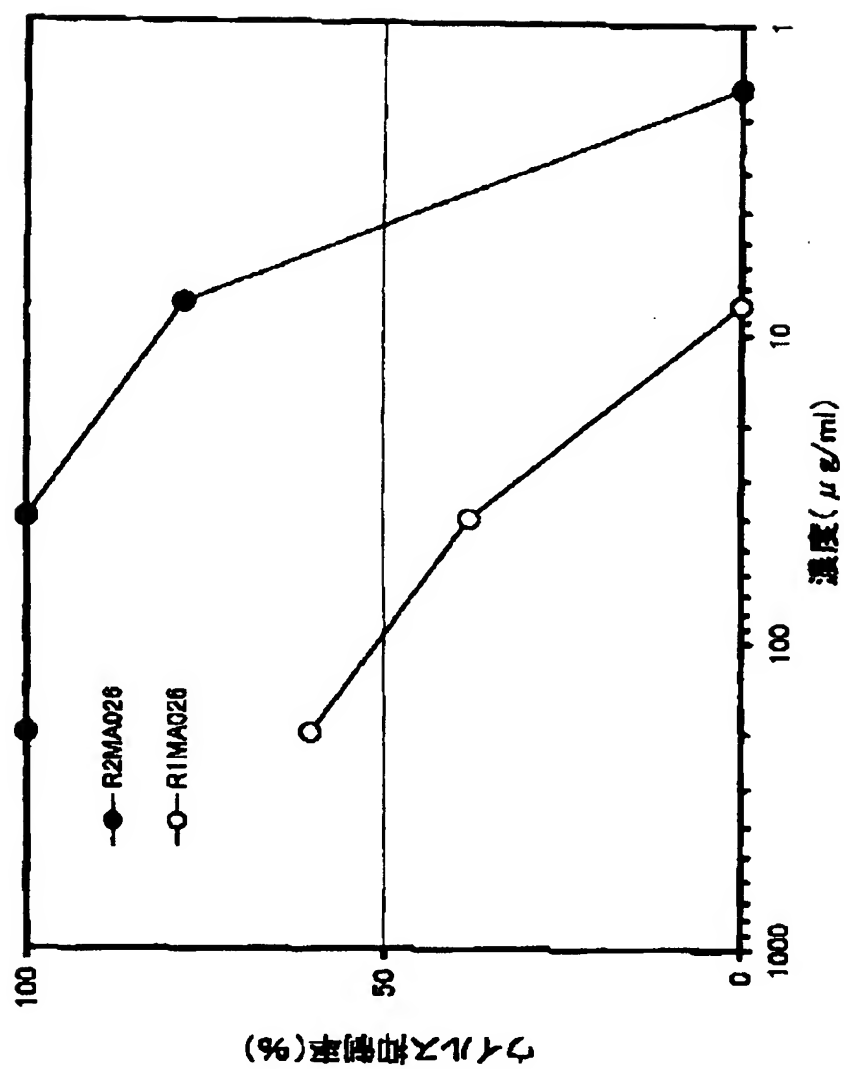
【図13】



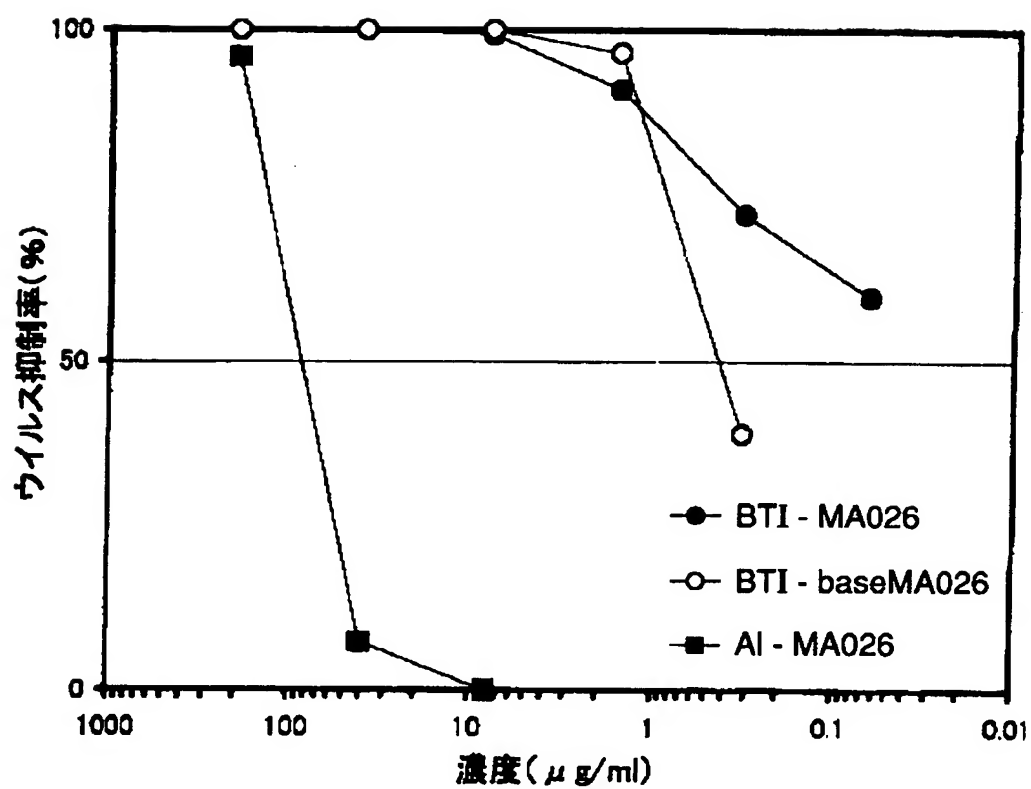
【図 14】



【図15】



【図16】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な抗ウイルス剤を提供すること。

【解決手段】 (1)構成アミノ酸がグルタミン4残基,グルタミン酸1残基,セリン1残基,バリン2残基,イソロイシン1残基及びロイシン5残基であり3-ヒドロキシデカノイル基がアミド結合によりN末端のロイシンに結合したペプチド,その誘導体;(2)構成アミノ酸がグルタミン及びグルタミン酸の総数が5残基,セリン1残基,バリン3残基,並びにロイシン5残基であり有機化合物が前記アミノ酸のいずれかに共有結合したペプチド;(3)グルタミン及びグルタミン酸の総数が5残基,セリン1残基,バリン2残基,イソロイシン1残基,並びにロイシン5残基であり有機化合物が前記アミノ酸のいずれかに共有結合したペプチド;並びに(1)~(3)のペプチドの塩。(4)*Pseudomonas*属の新種の菌株。(1)~(3)のペプチド,その誘導体及び塩,並びに(4)新種の菌株の少なくとも1を有効成分として含有する抗ウイルス剤。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000222783]

1. 変更年月日 1990年 8月 3日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区港南2丁目13番40号

氏 名 東洋水産株式会社